

09/806650
PCT/JP 99/05448

04.10.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月 5日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第282143号

出願人
Applicant(s):

株式会社ヤクルト本社

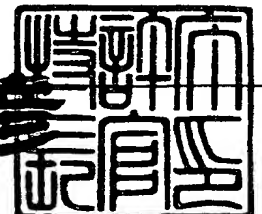
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3075796

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PJ23464
 【提出日】 平成10年10月 5日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 31/735
 A61K 35/80
 【発明の名称】 抗菌剤、消化器潰瘍予防・治療剤、及びその製造法
 【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
 本社内

【氏名】 長岡 正人

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
 本社内

【氏名】 柴田 英之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
 本社内

【氏名】 ▲高▼木 逸子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
 本社内

【氏名】 橋本 秀介

【特許出願人】

【識別番号】 000006884

【氏名又は名称】 株式会社ヤクルト本社

【代理人】

【識別番号】 100092082

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 正年

【代理人】

【識別番号】 100099586

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 年哉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007629

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9106022

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗菌剤、消化器潰瘍予防・治療剤、及びその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースに抗菌物質を結合させたことを特徴とする抗菌剤。

【請求項 2】 次の一般式で表されるフコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースの還元末端に抗菌物質を結合させたことを特徴とする抗菌剤。



〔式中、Yはフコイダン又はフコイダンの部分分解により調製されるオリゴフコース。Rは1級アミノ基を有するか又はアミノ基を導入した抗菌物質、又は抗菌物質をスペーサーを介してオリゴフコースに導入した誘導体を示す。nは糖鎖の還元末端のアルデヒド基の数に依存し、n=1又は2である。〕

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の抗菌剤を有効成分とするヘリコバクター・ピロリ菌用抗菌剤。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 に記載の抗菌剤を有効成分とする消化器潰瘍予防・治療剤。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 に記載された抗菌剤の製造法において、
フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースの還元末端の糖残基のアルデヒド基を、直接又は酸化分解により末端糖残基を開環させる工程と、
この開環されたアルデヒド基に対応する抗菌物質のアミンを作用させてシッフ塩基を生成させる工程と、
この生成されたシッフ塩基を還元する工程とを備えたことを特徴とする抗菌剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、胃潰瘍や胃癌の原因菌であるヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) の除菌に有効なフコイダン又はフコイダン部分分解により得られる

オリゴ糖の誘導体およびその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来、胃潰瘍の治療剤としては胃酸分泌抑制を目的としたH₂ブロッカーやプロトンポンプ阻害剤および胃粘膜保護剤が用いられている。これらの薬剤は有効な治療効果を示すものの、ヘリコバクター・ピロリの感染者は再発を繰り返すことが知られている。

【0003】

また、このヘリコバクター・ピロリ菌の感染者には、統計的に胃癌の発症率が高いことも知られている。このため消化性潰瘍の根本的な治療もしくは胃癌の予防という観点から、ヘリコバクターピロリの除菌治療が必要であることが指摘されている（Helicobacter pyloriと胃粘膜病変；浅香正博著、先端医学社、Helicobacter pylori治療ガイドライン資料；日本消化器病学会、Helicobacter pylori治療検討委員会）。

【0004】

これより抗生物質と胃酸分泌抑制剤とを併用した除菌治療が行われている。しかしながら、この方法は除菌効果が高いものの、比較的多量の抗生物質を用いるために下痢や耐性菌の出現の問題が生じてきている。

【0005】

一方、本発明者らはモズクや青海苔等の部分分解物から調製されるオリゴ糖の誘導体が胃潰瘍に対して、治療促進作用を示すのみならずヘリコバクター・ピロリに対する定着阻害作用や抗菌効果を示すことを先に見出した（特願平9-240298号）。しかしながら、本物質は潰瘍の治療促進作用は強いものの、その抗菌作用は満足すべきものではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、鋭意研究を行った結果、フコイダン又はフコイダンを酸処理等によりオリゴ糖としたものから、更に過ヨウ素酸酸化、対応するアミン類（抗菌物質）との反応、及び還元処理により糖誘導体を製造し、このものがヘリコバク

ター・ピロリに対して高い親和性、及び、優れた抗菌効果を有していることを確認して本発明に至った。

【0007】

本発明は、ヘリコバクター・ピロリに対して高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに対して特異的な抗菌効果を有する抗菌剤を得ることを目的とする。

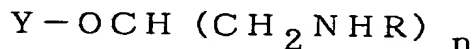
【0008】

【課題を解決するための手段】

本請求項1に記載された発明に係る抗菌剤は、フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースに抗菌物質を結合させたものである。

【0009】

本請求項2に記載された発明に係る抗菌剤は、次の一般式で表されるフコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースの還元末端に抗菌物質を結合させたものである。



[式中、Yはフコイダン又はフコイダンの部分分解により調製されるオリゴフコース。Rは1級アミノ基を有するか又はアミノ基を導入した抗菌物質、又は抗菌物質をスペーサーを介してオリゴフコースに導入した誘導体を示す。nは糖鎖の還元末端のアルデヒド基の数に依存し、n=1又は2である。]

【0010】

本請求項3に記載された発明に係るヘリコバクター・ピロリ菌用抗菌剤は、請求項1又は2に記載の抗菌剤を有効成分とするものである。

【0011】

本請求項4に記載された発明に係る消化器潰瘍予防・治療剤は、請求項1又は2に記載の抗菌剤を有効成分とするものである。

【0012】

本請求項5に記載された発明に係る抗菌剤の製造法は、請求項1又は2に記載された抗菌剤の製造法において、

フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースの還元末端の糖残基のアルデヒド基を、直接又は酸化分解により末端糖残基を開環させる工程と、

この開環されたアルデヒド基に対応する抗菌物質のアミンを作用させてシッフ塩基を生成させる工程と、

この生成されたシッフ塩基を還元する工程とを備えたものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の抗菌剤は、フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースに抗菌物質を結合させたものであるため、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) に対して高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに対して特異的な抗菌効果を有する抗菌剤を得ることができる。

【0014】

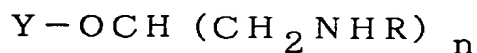
即ち、フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースはヘリコバクター・ピロリに高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに特異的に吸着又は結合してヘリコバクター・ピロリの胃壁に対して定着阻害を起こす。本発明では、このフコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースのヘリコバクター・ピロリに対する特異性を利用し、フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースに抗菌物質を結合させた抗菌剤を作成し、抗菌物質を有効的にヘリコバクター・ピロリに適用することができる。

【0015】

また、本発明の抗菌剤は、ヘリコバクター・ピロリ以外の病原性細菌に対しても抗菌効果を有するため、これらの菌に適用してもよい。

【0016】

好ましい本発明の抗菌剤は、次の一般式で表されるフコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースの還元末端に抗菌物質を結合させたものである。



[式中、Yはフコイダン又はフコイダンの部分分解により調製されるオリゴフコース。Rは1級アミノ基を有するか又はアミノ基を導入した抗菌物質、又は抗菌物質をスペーサーを介してオリゴフコースに導入した誘導体を示す。nは糖鎖の還元末端のアルデヒド基の数に依存し、n=1又は2である。]

【0017】

具体的には、式中のYはフコイダン又はフコイダンの部分分解により調製されるオリゴフコースであって、一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。フコイダンとしては、分画サイズの異なる限外濾過膜を組み合わせ分子量300～5000程度に調製したオリゴフコースを用いれば、より少量の抗生物質量で高い抗菌効果が得られ、特に分子量500～3000が好ましい。

【0018】

式中のRは、1級アミノ基を有するか、又はアミノ基を導入したセフェム系、ペニシリン系、アミノ酸糖体系、マクロライド系、ビリドカルボン酸系、オキサフェム系、モノバクタム系、カルバペネム系、テトラサイクリン系、ペプチト系やクロラムフェニコール、サルファ剤等の抗菌物質、もしくはこれらの物質をスパーサーを介してオリゴフコースに導入した誘導体であればよい。

【0019】

この抗菌剤は、特にヘリコバクター・ピロリに対して高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに特異的に吸着又は結合すると考えられるため、特にヘリコバクター・ピロリ菌用抗菌剤として有効である。更に、ヘリコバクター・ピロリ菌を特異的に阻害するため、消化器潰瘍予防・治療剤として用いることができる。

【0020】

このフコイダン又はフコイダンより得られるオリゴフコースの誘導体製造法の一実施の形態は次に示す通りである。

【0021】

ステップ1：フコイダンを含有する海藻類（モズク、クロメ、ヒバマタ等の褐藻類）より多糖を公知の抽出方法（例えば、松田和雄著、生物化学実験法 No.20、多糖の分離・精製法、学会出版センター等）にて抽出する。

【0022】

ステップ2：得られたフコイダンを0.05M～0.1M程度の塩酸もしくはトリフルオロ酢酸の溶液に溶解し、100℃、10分～20分加熱処理しオリゴ糖化し、水酸化ナトリウムにて中和する。このオリゴ糖化は、フコイダナーゼ（フコイダン分解酵素）を用い行ってもよく、その際の反応条件は適宜決定すればよい。

こうして得られたオリゴ糖の溶液に NaBH_4 を加え室温もしくは 4°C にて 16 時間、還元処理を行う（特開平 6-247861 公報、特開平 7-138166 号公報参照）。

【0023】

ステップ 3：ステップ 2 の操作により得られたオリゴ糖のアルジトール体の溶液を電気透析（マイクロアシライザー、旭化成社製）にて脱塩する。

【0024】

ステップ 4：ステップ 3 の溶液にメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え氷温下で 1 時間程度反応する（反応時間は糖鎖の構造により、例えば $1 \rightarrow 3$ 結合のオリゴ糖などの場合、より長時間反応してもよい）。反応液に過ヨウ素酸に対し過剰量のエチレングリコールを加え、更に 1 時間反応する。本液をステップ 3 と同様の方法で脱塩する。本操作により還元末端にアルデヒド基を有するオリゴ糖が得られる。

【0025】

ステップ 5：ステップ 4 で調製した試料に 0.5M 濃度となるように酢酸を加え、室温下で 20 時間反応させる（非還元末端側の糖鎖が酸化されない条件であれば本操作を省略してもよい）。反応液を目的とする分画分子量の限外濾過膜もしくは透析膜を用いて脱塩及びエチレングリコールやその分解物を除き、オリゴ糖を得る。またオリゴ糖画分はこれらの方法で精製する以外に、活性炭クロマトグラフィーやゲル濾過等を用いて所望の分子量サイズを調製してもよい。

【0026】

ステップ 6：オリゴ糖画分を水に溶解し、導入する抗菌剤を加え室温にて 1 時間反応し、シッフ塩基を形成させる。

【0027】

ステップ 7：ステップ 6 で得られた液にボランジメチルアミンを加え室温下、20 時間反応させ、シッフ塩基を還元する。還元剤にはボランジメチルアミンの他に、本発明に合致するような還元剤（例えば、ボラントリメチルアミン、 NaCNBH_3 、 NaBH_4 など）が適宜利用できる。

【0028】

ステップ8：反応終了後、限外濾過もしくは透析により過剰の試薬を除く。除去物は凍結乾燥等で乾燥させるか、イオン交換クロマトグラフィー等で更に精製してもよい。この方法により得られたオリゴ糖誘導体は、消化器潰瘍の原因菌であるヘリコバクター・ピロリに対する抗菌効果を有することが確認された。

【0029】

尚、ステップ2及び3を省略し、フコイダンそのものから多糖誘導体を調整しても同様の効果を得ることができる。また、本発明の抗菌剤の剤形や投与量は任意に選択することができるものの、例えば分子量500～3000オリゴフコースより調整した誘導体を用いる場合には、成人に対し100mg/日～500mg/日、特に200mg/日～300mg/日の投与を行えば、副作用を抑制すると共に、高い抗菌効果を得ることが可能となる。抗菌効果を得るためには、フコイダンの分子量が大きいほどその投与量も多量となるため、前期の分子量以外のものを用いる際には、適宜添加量を調節すればよい。

【0030】

また、一般的には、本発明の抗菌剤の剤形や投与量は任意に選択することができる。しかしながら、一般的には、本剤を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合し、且つ必要に応じて、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等に製剤して使用するのが適当である。

【0031】

【実施例】

実施例1．オリゴフコース誘導体の製造

(1・1) フコイダンの抽出及びオリゴフコースの製造

沖縄モズク (*Cladosiphon okamuranus* Tokida) を脱イオン水にて塩抜きを行った後、藻体1kg当たり1リットルの割合で脱イオン水に懸濁し、本懸濁液を塩酸でpH2とした。本液を100℃、10分間加熱抽出後、ガーゼにて藻体を濾別し、濾液を更に遠心し不溶物を除いた(9000rpm、60分)。

【0032】

上清をNaOHにて中和後、0.2M濃度になるようにメタ過ヨウ素酸ナトリ

ウムを加え、混入してくるアルギン酸やウロン酸成分を分解した。遮光下にて20時間反応後、エチレングリコールにて反応を停止した。本液に水素化ホウ素ナトリウムを0.2M濃度になるように加え、室温にて16時間反応した。本液を限外濾過（分画分子量5,000）にて濃縮後、透析した。透析内液を塩酸にてpH2とし、100℃、10分間加熱処理した。処理液を透析後、凍結乾燥しフコイダンを得た（4g/1kg湿藻体）。

【0033】

(1・2) オリゴフコースの調製と過ヨウ素酸酸化

フコイダンを200mg/mLの濃度に溶解し、0.075M～0.1M濃度となるように塩酸（又はトリフルオロ酢酸でも可）を加えた。100℃にて10分、加熱後、室温まで冷却する。本液をNaOHにて中和後、 NaBH_4 をフコイダン1gにつき200mgの割合で加えた。4℃にて20時間反応した。

【0034】

反応液を酢酸にてpH6とし、電気透析装置（旭化成、マイクロアシライザー、AC220膜使用）にて脱塩した。脱塩後、試料溶液に0.2M濃度となるように、 NaIO_4 を加え、氷温下にて1時間反応させた。反応液にエチレングリコールを過ヨウ素酸に対し2当量加え、氷温下にて更に1時間反応した。反応液を分画分子量1000の限外濾過膜（ミリポア社製）にてろ過、濃縮した。内液を凍結乾燥し、オリゴフコースのアルデヒド誘導体を得た（収率約25%）。

【0035】

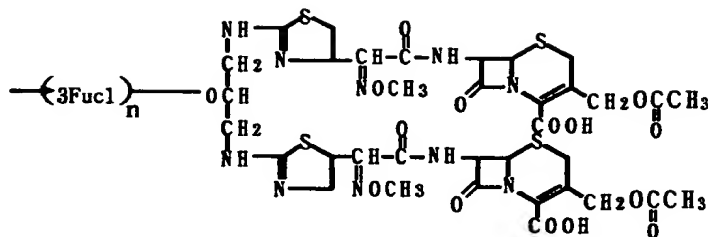
(1・3) 抗菌物質とのカップリング反応及び還元反応

(1・2)で製造したオリゴ糖のアルデヒド誘導体（5g）を水100mLに溶解し、1gのセファトキシナム（CTX）を加えた。0.5M、 NaHCO_3 溶液（pH8.5）を1mL加え、室温下で1時間反応下。反応後、ボランジメチルアミン複合体を、1g加え、室温下にて20時間反応させた。反応液は、分画分子量1000の透析膜にて、一昼夜、透析後、凍結乾燥して目的とする試料（OF-CTX）を得た（収量1.14g）。図1は得られたOF-CTXの $^1\text{C-NMR}$ を示す線図である。得られたOF-CTXの具体的な化学式は次の化1に示す通りである。

【0036】

【化1】

OF-CTX



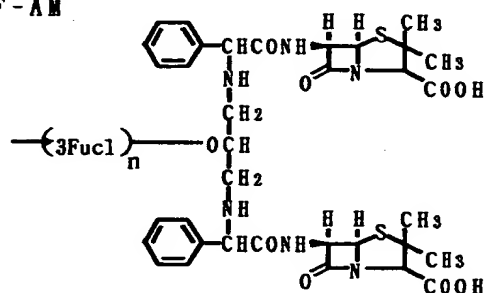
【0037】

(1・3)と同様に、セファトキシナムの代わりにアンピシリンと反応させ、反応液を同様に処理し、オリゴフコースアンピシリン誘導体(OF-AM)を得た。得られたOF-AMの具体的な化学式は次の化2に示す通りである。

【0038】

【化2】

OF-AM



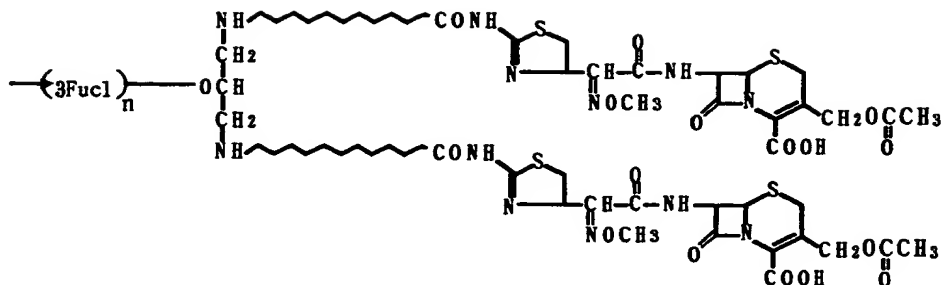
【0039】

オリゴフコース2gを80mLの40%エタノール水に溶解(0.05M, NaCO₃)。12-アミノラウリン酸(C12)、350mgを加え、45℃1時間反応した。ボランジメチルアミンを300mg加え、45℃にて16時間反応した。反応後カットオフ1000の透析チューブにて透析した。透析物の凍結乾燥品(875mg)を10mLの水に溶解し、EDC 500mgを加えた。室温で2時間反応後、セファトキシナムNaを350mg加え、4時間反応した。反応後分画分子量、1000の透析膜にて2日間透析後、凍結乾燥し誘導体を得た(OF-C12-CTX、収量384mg)。得られたOF-C12-CTXの具体的な化学式は次の化3に示す通りである。

【0040】

【化3】

OF-C12-CTX



【0041】

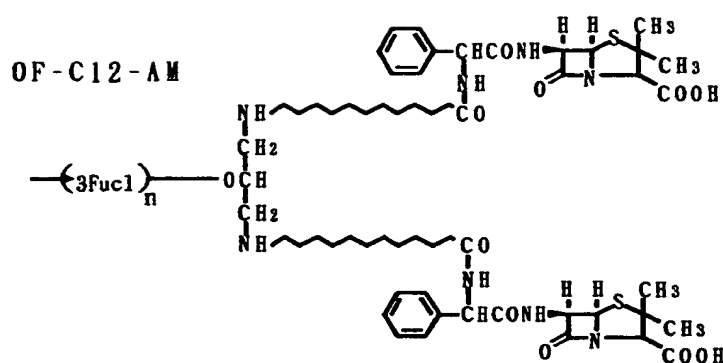
アミノラウリル酸4. 5gを200mLの30%エタノール水に懸濁し、NaOHを適宜加え、溶解した。溶液に14.5gのオリゴフコースを加え、40℃、1時間反応した。ボランジメチルアミンを3g加え、40℃にて20時間反応した。塩酸でpH5とし、9000rpm、15分遠心後、上清を分画分子量1000カットの透析膜にて透析した。透析物をろ過後、凍結乾燥し、オリゴフコースのアミノラウリル酸誘導体を得た。(収量2.67g)。

【0042】

得られた誘導体を40mLの水に懸濁し、メタノールを溶解するまで加えた。塩酸でpH5とし、水溶性カルボジイミド3.5g、N-ヒドロキシスクシイミド1.5gを加え、室温下20時間反応した。反応液を透析後、凍結乾燥し、乾燥物1.2gを水20mLに溶解するした。この液に0.5gのアンピシリンナトリウムを加え、1M、NaHCO₃を1mL加えた。室温下、20時間反応後、反応液を、1000カットの透析膜にて透析する。透析内液をろ過後、凍結乾燥しオリゴフコースにスパーサを導入したアンピシリン誘導体(OF-C12-AM)を得た(収量230.6mg)。得られたOF-C12-AMの具体的な化学式は次の化4に示す通りである。

【0043】

【化 4】



【0044】

実施例 2. ヘリコバクター・ピロリの抗菌作用の検証 1

ヘリコバクター・ピロリ増殖阻害活性は以下の方法で測定した。1 mL のブルセラ培地にヘリコバクター・ピロリ臨床分離株 (1.5×10^8 CFU/mL) を 100 μ L 加え、更に 1 mg/mL の OF-CTX 若しくはセファトキシナム (CTX) を 0, 3, 6, 9, 12 μ L ずつ加える。37℃にて3日間培養後、濁度 (A600nm) を測定し増殖率を測定した。結果を図 2 に示す。

【0045】

図に示した通り、OF-CTX はヘリコバクター・ピロリに対し 6 μ g/mL の濃度でほぼ完全に増殖を阻害した。本活性はセファトキシナムより若干弱いものの、OF-CTX 分子中のセファトキシナム含有量はモル比でフコース量の約 1/10 であることから、OF-CTX の活性は CTX 単体の活性よりも高いものであると考えられる。

【0046】

実施例 3. ヘリコバクター・ピロリの抗菌作用の検証 2

ヘリコバクター・ピロリを 25 mL のブルセラ培地に懸濁し、各 500 μ L ずつ分注し、本液に 30 μ L の培地のみ、1 mg/mL の OF-CTX を加え、0℃にて 0~25 分処理する。14000 rpm、7 分遠心後、沈渣を 1 mL の培地に再懸濁し、その内 100 μ L ずつ分注する。本液に 1 mL の培地を加え、37℃にて3日間培養後、600 nm における濁度を測定した。その結果、対照群の濁度が 0.494 であるのに対し、OF-CTX 前処理群の濁度は 0.153

であり、約 70% の増殖阻害効果を示したことになる。

【0047】

以上のように、本発明によれば、フコイダンやオリゴフコースの誘導体はヘリコバクター・ピロリに対し抗菌作用を有し、且つ実施例 3 に示したように、これら誘導体は洗浄後も効果を示すことから、ヘリコバクター・ピロリに接着し、効果を示すものと考えられた。これにより、これらの誘導体はヘリコバクター・ピロリに指向性（特異性）を有した抗菌剤として、胃潰瘍や胃癌の治療に有益な薬剤として利用できる。

【0048】

【発明の効果】

本発明は以上説明した通り、ヘリコバクター・ピロリに対して高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに対して特異的な抗菌効果を有する抗菌剤を得ることができるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

OF-CTX の ^{13}C -NMR を示す線図である。

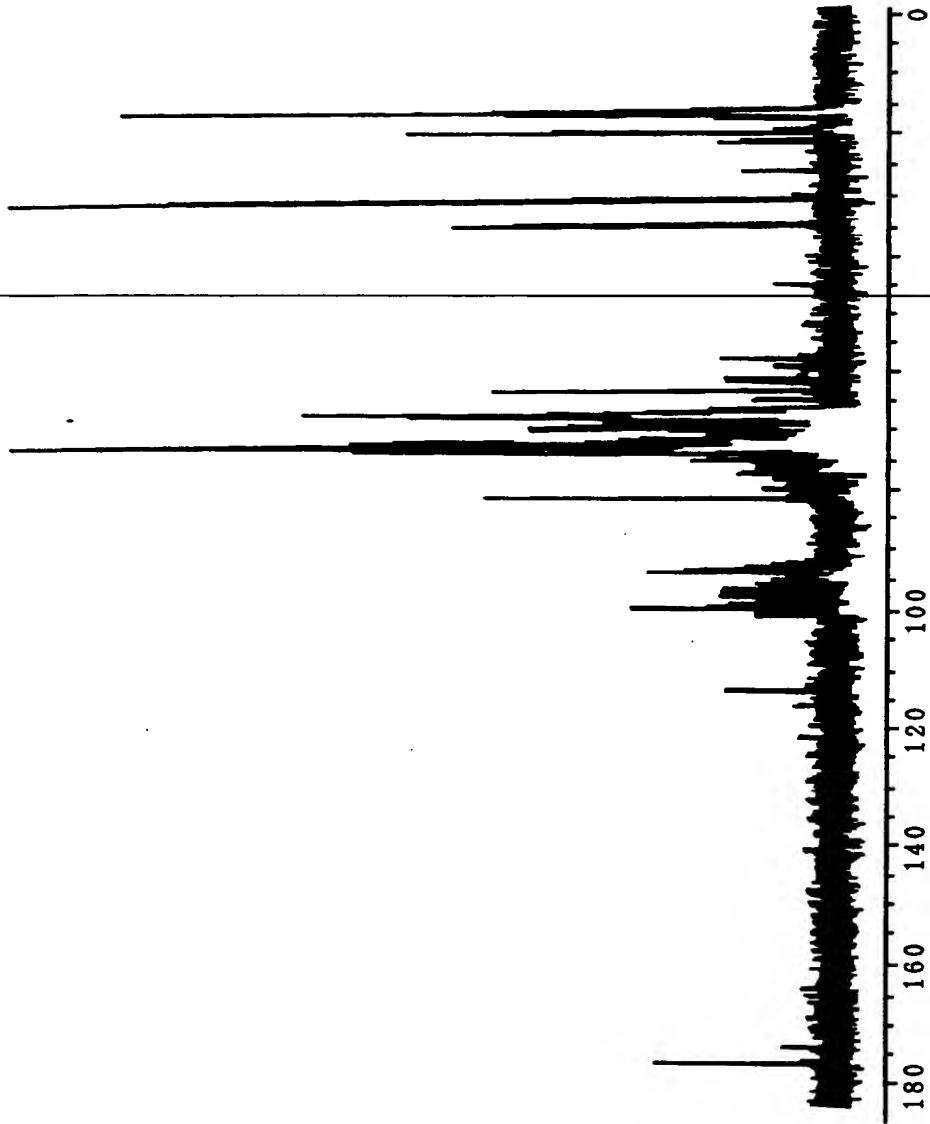
【図 2】

OF-CTX と CTX とのヘリコバクター・ピロリ増殖阻害効果を示す線図である。

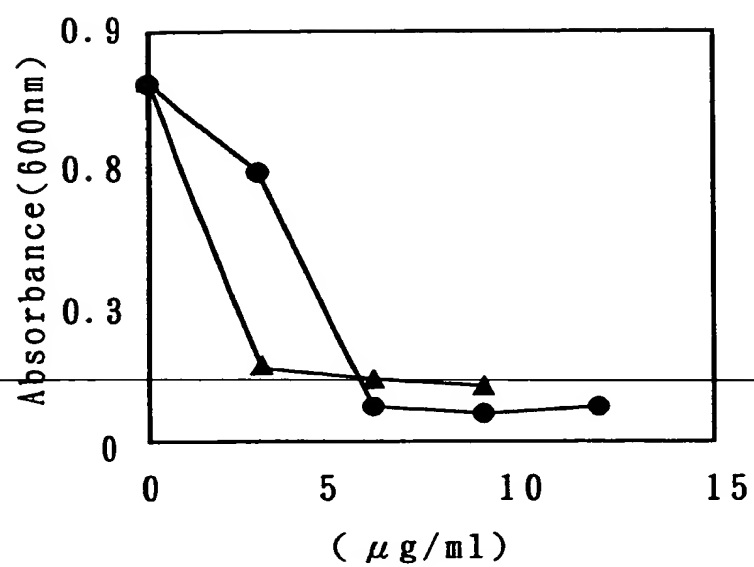
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヘリコバクター・ピロリに対して高い親和性を有し、ヘリコバクター・ピロリに対して特異的な抗菌効果を有する抗菌剤を得る。

【解決手段】 フコイダン又はフコイダンを部分分解したオリゴフコースに抗菌物質を結合させたもの。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006884

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号

【氏名又は名称】 株式会社ヤクルト本社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100092082

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2虎
 ノ門ビル 三和国际特許事務所

【氏名又は名称】 佐藤 正年

【代理人】

【識別番号】 100099586

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2虎
 ノ門ビル 三和国际特許事務所

【氏名又は名称】 佐藤 年哉

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006884]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号

氏 名 株式会社ヤクルト本社
